

# Rola zjawiska „wytrenowanej odporności” w patogenezie miażdżycy

Zaneta Markowska

Zakład Biochemii Komórki

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

zaneta.markowska@student.uj.edu.pl

Praca napisana pod opieką: prof. dr hab. Joanny Berety

**Miażdżyca to przewlekła choroba zapalna tętnic, charakteryzująca się tworzeniem zmian w obrębie ściany naczyń i powstawaniem blaszek miażdżycowych. Monocyty i makrofagi, wyspecjalizowane w nieswoistej eliminacji patogenów, są najliczniej występującymi komórkami w obrębie blaszek miażdżycowych. Pomimo powszechnie panującego przekonania, że komórki wrodzonego układu odpornościowego nie są w stanie wytworzyć pamięci immunologicznej, ostatnie badania wykazały, że potrafią one budować pamięć o przebytych wcześniej infekcjach. Zjawisko to oparte na reprogramowaniu metabolicznym i epigenetycznym zostało nazwane „wytrenowaną odpornością” (ang. trained immunity). Długotrwały fenotyp proaterogenny, czyli sprzyjający rozwojowi miażdżycy, indukowany jest przez czynniki mikrobiologiczne oraz zmodyfikowane lipoproteiny. Wzmocniona produkcja cytokin i chemokin prozapalnych przez „trenowane” komórki może przyczyniać się do przewlekłego stanu zapalnego ściany naczyń, promując tym samym rozwój miażdżycy.**

## Czym jest „wytrenowana odporność”?

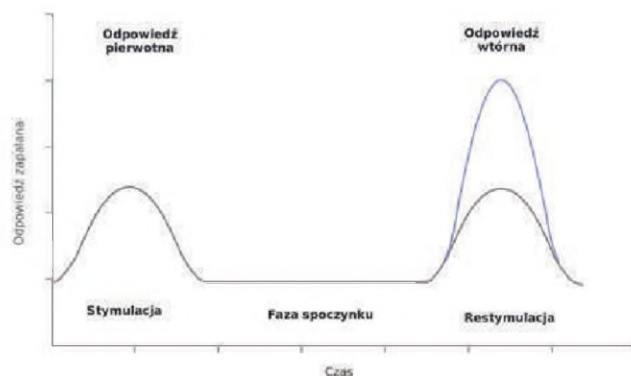
Układ odpornościowy wyspecjalizowany jest w skutecznej ochronie organizmu przed infekcjami na kilku liniach obrony. Jedną z nich stanowią komórki wrodzonego układu odpornościowego (ang. *innate immune system*), odpowiedzialne za szybką i nieswoistą eliminację patogenów. Zaliczane są do nich komórki fagocytyczne (w tym makrofagi, neutrofile, komórki dendrytyczne), komórki NK (ang. *natural killer*), eozynofile, bazofile oraz komórki tuczne wykorzystujące do walki

z drobnoustrojami układ dopełniacza i sieć mediatorów stanu zapalnego takich jak cytokiny i chemokiny. Makrofagi są wyspecjalizowane w fagocytozie mikroorganizmów oraz zakażonych, uszkodzonych lub obumierających komórek. Dodatkowo, poprzez wydzielanie mediatorów stanu zapalnego, makrofagi aktywują do odpowiedzi inne komórki układu odpornościowego, koordynując w ten sposób odpowiedź immunologiczną. W niektórych przypadkach pierwsza, nieswoista linia obrony wystarcza do eliminacji zagrożenia. W innych przypadkach dochodzi do rozwoju swoistej

odpowiedzi immunologicznej, podczas której limfocyty B i T specyficznie rozpoznają antygeny mikroorganizmów. Część limfocytów B i T staje się komórkami pamięci, zdolnymi do szybkiej reakcji na ponowne pojawienie się tego samego patogenu [1].

Do tej pory wydawało się, że komórki odporności wrodzonej nie są zdolne do wytworzenia pamięci immunologicznej. Jednak nowe doniesienia sugerują, że monocyty, makrofagi czy komórki NK potrafią budować pamięć o wcześniejszych kontaktach z patogenami i przy powtórnej stymulacji odpowiadać wzmożoną produkcją mediatorów stanu zapalnego [2] (Ryc. 1). Zjawisko to, opierające się na budowaniu długotrwałego fenotypu prozapalnego przez komórki wrodzonego układu odpornościowego, zostało nazwane „wytrenowaną odpornością” (ang. *trained immunity*). Po raz pierwszy opisał je w 2011 r. Mihai Netea i jego współpracownicy [3]. Zgodnie z przedstawioną koncepcją, monocyty wykazują fenotyp „wytrenowanej odporności” po

ekspozycji na wzorce molekularne związane z patogenami (ang. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) takimi jak drożdżowy  $\beta$ -glukan, czy atenuowane prątki gruźlicy bydłej (*Bacillus Calmette-Guérin*, BCG) [4, 5]. PAMP to cząsteczki, które służą jako ligandy dla receptorów rozpoznawania wzorców (ang. *pattern recognition receptors*, PRR), z których wiele należy do rodziny TLR (ang. *toll-like receptor*) [6]. Ponadto badania dowodzą, że stymulacja monocytów endogennymi bodźcami proaterogennymi takimi jak utleniona lipoproteina o małej gęstości (oxLDL) i lipoproteina (a), należącymi do wzorców molekularnych związanych z uszkodzeniem (ang. *damage-associated molecular patterns*, DAMP) również sprzyja przejściu monocytów w nadreaktywny fenotyp [7, 8]. Chociaż „wytrenowana odporność” wydaje się być korzystna w kontekście obrony gospodarza przed nawracającymi infekcjami, może równocześnie przyczyniać się do przewlekłych stanów zapalnych i korelować



**Ryc.1.** Schemat przedstawiający powstawanie „wytrenowanej odporności”. W badaniach *in vitro* komórki po wystawieniu na działanie stymulanta, zostają wprowadzone w fazę spoczynku, a następnie poddawane są restymulacji. W przypadku zjawiska „wytrenowanej odporności” ponowna stymulacja komórek wrodzonego układu odpornościowego, przyczynia się do wzmocnienia wtórnej odpowiedzi immunologicznej przez zwiększoną produkcję cytokin prozapalnych i chemokin (niebieska linia). W koncepcji klasycznej zarówno odpowiedź pierwotna jak i wtórna oscylują na tym samym poziomie (szara linia). Na podstawie: Petit & Wiegertjes. *Developmental & Comparative Immunology*, 2016 [10].

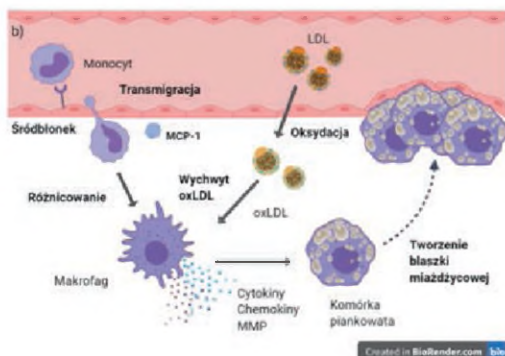
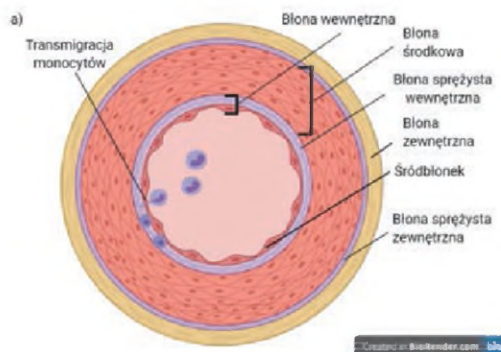
z rozwojem miażdżycy [9].

## Nowe spojrzenie na mechanizm rozwoju miażdżycy

Miażdżycę charakteryzuje się trwałym stanem zapalnym ściany tętnic, którego końcowym efektem jest tworzenie się blaszek miażdżycowych. Komórkami najliczniej w nich występującymi są makrofagi, pochodzące z krążących monocytów, które przedostają się pomiędzy zaktywowanymi komórkami śródbłonna naczyń krwionośnych do leżącej poniżej tkanki łącznej, gdzie ulegają różnicowaniu do makrofagów. Nagromadzenie lipoprotein o małej gęstości (LDL) w obszarze podśródbłonkowym oraz ich późniejsza modyfikacja oksydacyjna przyczyniają się do zapoczątkowania rozwoju miażdżycy przez aktywację makrofagów, znajdujących się w tkance łącznej błony wewnętrznej [11-13] (Ryc.2).

Opisanie zjawiska „wytrenowanej odporności” otworzyło drogę dla nowych

koncepcji patogenezy miażdżycy. Najnowsze badania dowodzą, że izolowane ludzkie komórki monocytarne poddawane „treningowi odpornościowemu” przez pierwotną stymulację oxLDL, podczas wtórnej stymulacji agonistami receptorów TLR2 i TLR4 wykazują zwiększoną produkcję cytokin prozapalnych takich jak TNF (ang. *tumor necrosis factor*), interleukin 6, 8, 18 oraz chemokiny MCP-1 (ang. *monocyte chemoattractant protein 1*) w porównaniu z odpowiedzią pierwotną. Co więcej, trening komórek oxLDL-em powodował wzrost ekspresji cząsteczek CD36 i SRA (ang. *class A scavenger receptor*) odpowiedzialnych za wychwyt oxLDL-u, skutkując znacznym obciążeniem makrofagów zmodyfikowaną lipoproteiną. Dodatkowo zaobserwowano zmniejszoną ekspresję transporterów wypływu cholesterolu ABCA1 i ABCG1, które stanowią istotny element odwrotnego transportu cholesterolu (ang. *reverse cholesterol transport, RCT*) [8]. Proces



**Ryc.2.** a) Przekrój poprzeczny tętnicy. Schematyczne przedstawienie transmigracji monocytów do podśródbłonkowego obszaru błony wewnętrznej. b) Proces rozwoju miażdżycy. Czynniki MCP-1 oraz inne chemokiny syntetyzowane są przez zaktywowane komórki śródbłonna, komórki mięśni gładkich i makrofagi w odpowiedzi na utlenione lipidy. Krążące monocyty są wychwytywane przez śródbłonek i ulegają transmigracji do podśródbłonkowego obszaru błony wewnętrznej, a następnie różnicowaniu w makrofagi. Wychwyt oxLDL za pośrednictwem receptorów zmiataczy (ang. *scavenger receptors, SR*) powoduje przejście makrofagów w komórki piankowe. Wzmocniona produkcja cytokin, chemokin i metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej przez zaktywowane komórki układu immunologicznego promuje rozwój blaszek miażdżycowych. Na podstawie: Kishimoto Y, et al. *Marine Drugs*, 2016. [16].

ten zapobiega rozwojowi miażdżycy przez przeniesienie cholesterolu ze ściany naczynia do wątroby w celu wydalania go z organizmu [14]. Obniżona ekspresja transporterów ABCA1 i ABCG1, przyczynia się do znaczącego nagromadzenia cholesterolu w makrofagach, który może ulegać estryfikacji przez acetylo-CoA acetylotransferazę (ACAT1) [15]. Wzmoczony wychwyt utlenionej lipoproteiny przez molekuły CD36, SRA oraz ograniczony wpływ cholesterolu i jego modyfikacja przez ACAT1 skutkują przechodzeniem makrofagów w komórki piankowate (ang. *foam cells*). Jest to rodzaj makrofagów obciążonych lipidami, wydzielających liczne mediatory stanu zapalnego. Wyniki te sugerują, że długotrwały fenotyp proaterogeny indukowany przez oxLDL może powodować przewlekłe zapalenie ściany naczynia, przyczyniając się tym samym do rozwoju miażdżycy. Ponadto makrofagi poddawane treningowi oxLDL-em wykazywały zwiększoną ekspresję metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej 2 i 9 (MMP-2 i MMP-9), co może powodować destabilizację blaszek miażdżycowych poprzez remodeling ECM (ang. *extracellular matrix*) [8].

Odrębne badanie nad rolą „wytrenowanej odporności” w rozwoju miażdżycy polegało na porównaniu odpowiedzi zapalnej monocytów izolowanych od pacjentów z objawową i bezobjawową chorobą niedokrwienną serca (ang. *coronary artery disease*, CAD). Monocyty izolowane od osób z objawową CAD, stymulowane bakteryjną endotoksyną, czyli lipopolisacharydem (LPS), ligandem dla receptora

TLR4, wykazywały wzmoczoną produkcję mediatorów stanu zapalnego (IL-6, TNF, IL-1 $\beta$ , IL-8 oraz MCP-1), w przeciwieństwie do monocytów pochodzących od pacjentów bezobjawowych. Dodatkowe zmiany na poziomie epigenetycznym i metabolicznym wskazały na możliwą rolę „wytrenowanej odporności” w progresji łagodnych zmian miażdżycowych w kierunku choroby objawowej [11].

### **Reprogramowanie metaboliczne, a fenotyp „wytrenowanej odporności”**

Jednym z mechanizmów stojących u podłoża zjawiska „wytrenowanej odporności” jest dogłębne reprogramowanie metaboliczne komórek wrodzonego układu odpornościowego. Charakterystyczną cechą zmian metabolicznych zachodzących w „trenowanych” makrofagach jest efekt Warburga, czyli przejście komórek na preferencyjny metabolizm glikolityczny z jednoczesną redukcją szlaku fosorylacji oksydacyjnej. Skutkuje to akumulacją metabolitów cyklu Krebsa takich jak fumaran czy bursztynian oraz zwiększoną produkcją mleczanu. Wzmoczona glikoliza jest skutkiem stymulacji czynnika HIF-1 $\alpha$  przez ścieżkę Akt-mTOR w odpowiedzi na działanie czynników zapalnych (PAMPs, DAMPs) oraz hipoksji. Ograniczona dostępność tlenu jest cechą charakterystyczną dla blaszek miażdżycowych i stanowi element łączący „wytrenowaną odporność” z rozwojem miażdżycy. Czynniki transkrypcyjny HIF-1 $\alpha$  inicjuje metabolizm glikolityczny, zwiększając eks-

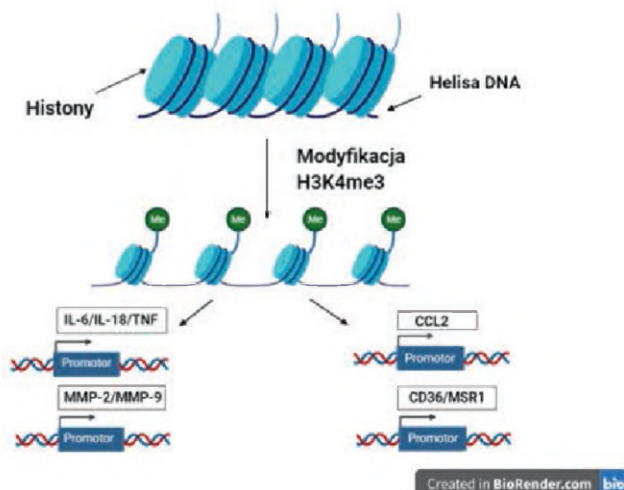
presję transportera glukozy GLUT-1 oraz kluczowego enzymu glikolitycznego, heksokinazy II (HKII), a także 6-fosfofrukto-2-kinazy/fruktozo-2,6-bisfosfatazy 3 (PFKFB3) [17,18]. Enzym ten bierze udział w syntezie i degradacji fruktozo-2,6-bisfosforanu, który jest silnym aktywatorem 6-fosfofruktokinazy-1 (PFK-1), enzymu stymulującego szlak glikolizy [19]. Warto zaznaczyć, że wzmożona glikoliza napędza jednocześnie szlak pentozofosforanowy (PPP) prowadząc do zwiększonej syntezy aminokwasów i nukleotydów, niezbędnych do proliferacji zaktywowanych makrofagów, a także do redukcji NADP. Co więcej, elektrony przekazywane z NADPH na cząsteczki tlenu przez oksydazy NADPH (NOX) przyczyniają się do powstawania reaktywnych form tlenu (ROS) i rozwoju stresu oksydacyjnego w blaszkach miażdżycowych [18]. Wzmocniona glutaminoliza, skutkująca nagromadzeniem fumaranu i bursztynianu to kolejny szlak ulegający reprogramowaniu w trakcie treningu odpornościowego komórek [20]. Dodatkowe eksperymenty wykazały, że czynnik HIF-1 $\alpha$ , aktywowany w obszarach niedotlenienia blaszek miażdżycowych, oprócz inicjowania metabolizmu glikolitycznego, nasila również syntezę kwasów tłuszczowych (FAS) przez stymulację desaturazy stearoilo-koenzymu A (SCD). Jednocześnie szlak oksydacji kwasów tłuszczowych (FAO), będący głównym źródłem energii w nietrenowanych komórkach, ulega zahamowaniu. Takie reprogramowanie metaboliczne przyczynia się do znacznego obciążenia makrofagów triglicerydami i przecho-

dzeniem w komórki piankowe, promując rozwój miażdżycy [21].

Warto zaznaczyć, że same metabolity również mogą indukować zjawisko „wytrenowanej odporności”. Ciekawy przykład stanowi mewalonian, produkt przejściowy szlaku syntezy cholesterolu, pełniący rolę potencjalnego mediatora treningu komórek przez aktywację szlaku Akt - mTOR, po zadziałaniu na komórki czynnikiem IGF1. Obniżenie poziomu cholesterolu przez statyny, powszechnie stosowane w leczeniu miażdżycy, hamuje „wytrenowaną odporność” właśnie przez zahamowanie syntezy mewalonianu, łagodząc tym samym przewlekły stan zapalny w ścianach naczyń krwionośnych [2].

### **Reprogramowanie epigenetyczne w „wytrenowanej odporności”**

Reprogramowanie epigenetyczne stanowi kolejny mechanizm determinujący prozapalny fenotyp komórek w opisanym zjawisku „wytrenowanej odporności”. Jak powszechnie wiadomo, modyfikacje histonów wpływają na strukturę chromatyny oraz dostępność DNA dla czynników transkrypcyjnych, co ma istotne znaczenie dla ekspresji genów. Acetylacja histonów przez acetylotransferazy histonowe (HAT) promuje otwartą strukturę chromatyny przez neutralizację ładunków elektrostatycznych na ogonach histonów. Metylacja z kolei, katalizowana przez metylotransferazy histonów (HMT), w zależności od pozycji modyfikowanej reszty, może przyczyniać się zarówno do zwiększonej, jak i zmniejszonej eks-



**Ryc. 3.** Reprogramowanie epigenetyczne (H3K4me3) w promotorach genów promujących rozwój miażdżycy. IL-6/18, interleukina 6/18; TNF, czynnik martwicy nowotworów; CCL2, czyli inaczej MCP-1, monocytny chemotaktyczny czynnik białkowy 1; MMP-2/9, metaloproteiny macierzy zewnątrzkomórkowej 2/9; CD36, receptor zmiatacz klasy III; MSR1, receptor zmiatacz klasy I. Na podstawie: Groh L, et al. *Semin Immunopathol*, 2018 [18]. Ilustracja przygotowana przy pomocy aplikacji BioRender (BioRender.com).

presji danego genu [22]. W kontekście rozwoju miażdżycy, monocyty poddawane treningowi odpornościowemu przy użyciu oxLDL odpowiadają wzbogaceniem trimetylowanych histonów H3 na lizynie 4 (H3K4me3) w promotorach genów kodujących TNF, IL-6, MCP-1, IL-8, CD36, SRA, MMP-2 i MMP-9. Modyfikacja ta promuje otwartą strukturę chromatyny, skutkując zwiększoną ekspresją mediatorów stanu zapalnego oraz transporterów lipoprotein, co ma istotny wpływ na rozwój miażdżycy (Ryc.3) [8]. W odrębnym badaniu zauważono natomiast, że podczas treningu monocytów oxLDL-em dwie represyjne modyfikacje histonów (H3K9me3 i H3K27me3) ulegają obniżeniu w promotorowych regionach genów czynników prozapalnych (IL-6, TNF). Zmniejszona ilość modyfikacji promujących upakowaną strukturę chromatyny skutkowała podwyższoną ekspresją mediatorów stanu zapalnego [11]. Warto zaznaczyć, że użycie 5'-metylotioadenozyny, niespecyficznego inhibitora metylotransferazy histonów, hamuje fenotyp proate-

rogeny makrofagów indukowanych przez oxLDL, co sugeruje znaczącą rolę przeprogramowania epigenetycznego dla „wytrenowanej odporności” [23].

### Czy infekcje mogą przyczyniać się do rozwoju miażdżycy?

Zjawisko „wytrenowanej odporności” może zostać wywołane przez wystawienie komórek na działanie zmodyfikowanych lipoprotein, ale także czynników mikrobiologicznych. Badania wykazały, że stymulacja monocytów drożdżowym  $\beta$ -glukanem powoduje wzmożone wydzielanie cytokin prozapalnych po restymulacji lipopolisacharydem (LPS), agonistą receptora TLR4. Zaobserwowano także charakterystyczne przejście komórek na metabolizm glikolityczny oraz reprogramowanie epigenetyczne w regionach promotorowych genów zaangażowanych w glikolizę i ścieżkę mTOR [24]. Sugeruje to, że ekspozycja komórek odporności wrodzonej na czynniki mikrobiologiczne wyzwala

długotrwały stan podatności na wzmocnioną aktywację, co może przyczyniać się do zwiększonego ryzyka rozwoju miażdżycy. Iniekcja BCG także prowadziła do „wytrenowanego” fenotypu monocytów, zwiększonej produkcji TNF i IL-1 $\beta$  oraz wzbogacenia H3K4me3 w promotorach genów kodujących cytokiny prozapalne oraz TLR4. Co ciekawe, prozapalny fenotyp monocytów pozostaje widoczny nawet 3 miesiące po podaniu BCG. Biorąc pod uwagę fakt, iż długość życia monocytów w krwiobiegu wynosi zaledwie 1–4 dni można zakładać, że „trening” odbywa się już na poziomie komórek progenitorowych szpiku kostnego [4, 25]. W kontekście rozwoju miażdżycy zauważono, że iniekcja BCG, pomimo rozwoju długotrwałego prozapalnego fenotypu monocytów, koreluje ze zmniejszoną częstością występowania chorób sercowo-naczyniowych (CVD). Sugeruje to, że szczepienie BCG może zapobiegać rozwojowi miażdżycy przez ograniczenie ilości późniejszych infekcji, które same mogłyby w znacznym stopniu przyczyniać się do rozwoju CVD przez wywoływanie zjawiska „wytrenowanej odporności”. Niezbędne jest pogłębienie stanu wiedzy na temat wpływu infekcji na zjawisko „wytrenowanej odporności”, aby lepiej zrozumieć zależność obu mechanizmów od siebie. Może to również pomóc w tworzeniu nowych strategii terapeutycznych zapobiegających rozwojowi miażdżycy u osób przechodzących ostre lub przewlekłe infekcje [25].

Przyszłe kierunki w praktyce klinicznej  
Aktualne leczenie chorób sercowo-na-

czyniowych opiera się na stosowaniu leków obniżających poziom cholesterolu oraz leków hipotensyjnych [18]. Okazuje się, że powszechnie stosowana metformina i statyny hamują szlaki glikolizy i syntezy cholesterolu w zaktywowanych komórkach układu immunologicznego [2,24]. Wydaje się więc wysoce prawdopodobne, że strategie oparte na bardziej specyficznych związkach niż metformina, zakłócających szlak glikolizy, mogą okazać się korzystne w kontekście leczenia miażdżycy [18]. Co więcej, reprogramowanie epigenetyczne w promotorach genów cytokin prozapalnych i kluczowych enzymów szlaków metabolicznych może zostać odwrócone z użyciem środków farmakologicznych hamujących enzymy modyfikujące strukturę chromatyny. Leczenie miażdżycy w oparciu o koncepcję epigenetyczną może skutkować inhibicją „wytrenowanej odporności” oraz zahamowaniem proaterogennego fenotypu komórek [26]. Wydaje się również, że samo hamowanie ekspresji i aktywności cytokin prozapalnych mogłoby służyć jako potencjalny cel terapeutyczny ograniczający rozwój miażdżycy, jako że same zaliczają się do silnych aktywatorów „wytrenowanej odporności” [17].

## **Podsumowanie**

Dogłębne poznanie mechanizmów kierujących rozwojem miażdżycy jest kluczowe do pełnego zrozumienia etiologii choroby i planowania nowych strategii terapeutycznych. Odkrycie zjawiska „wytrenowanej odporności”



stanowi innowacyjną koncepcję patogenyzy miażdżycy w oparciu o prozapalny fenotyp komórek układu immunologicznego. Mimo to, konieczna jest dalsza analiza zmian metabolicznych zachodzących w komórkach na poszczególnych stadiach choroby, aby określić moment, w którym reprogramowanie metaboliczne zaczyna sprzyjać progresji miażdżycy [17]. Ponadto dokładna znajomość przemian metabolicznych może ułatwić opracowanie biomarkerów diagnostycznych przez pomiar krążących w naczyniach metabolitów lub wizualizację glikolizy *in vivo* [21]. Ostatnie prace sugerują, iż „wytrenowana odporność” może pośredniczyć między przewlekłymi lub ostrymi infekcjami, a rozwojem miażdżycy [25]. Koncepcja „wytrenowanej odporności” rodzi także pytanie, czy odkryty mechanizm sprzyjający progresji zmian miażdżycowych, odgrywa jednocześnie rolę w chorobach autoimmunologicznych. Rosnąca ilość hipotez stwarza konieczność dalszych badań nad przedstawionym tematem i szczegółowego poznania procesów kierujących „wytrenowaną odpornością”.

## Podziękowania

Dziękuję za krytyczne uwagi dotyczące tekstu prof. dr hab. Joannie Berecie, prof. dr hab. Stefanowi Chłopickiemu oraz dr Marcie Stojak.

## Bibliografia

[1] Kenneth Murphy, Casey Weaver. Janeway's Immunobiology. 9<sup>th</sup> Edition. Garland Science. 2017.  
 [2] Bekkering S, Arts RJW, Novakovic B, et al. Metabolic induction of trained immunity through the mevalonate pathway. *Cell*.

2018;172(1-2):135-146.e9.

[3] Netea MG, Quintin J, van der Meer JWM. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host & Microbe*. 2011;9(5):355-361.  
 [4] Kleinnijenhuis J, Quintin J, Preijers F, et al. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012;109(43):17537-17542.  
 [5] Quintin J, Saeed S, Martens JHA, et al. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host & Microbe*. 2012;12(2):223-232.  
 [6] Amarante-Mendes GP, Adjemian S, Branco LM, Zanetti LC, Weinlich R, Bortoluci KR. Pattern recognition receptors and the host cell death molecular machinery. *Front Immunol*. 2018;9:2379.  
 [7] van der Valk FM, Bekkering S, Kroon J, et al. Oxidized phospholipids on lipoprotein(A) elicit arterial wall inflammation and an inflammatory monocyte response in humans. *Circulation*. 2016;134(8):611-624.  
 [8] Bekkering Siroon, Quintin Jessica, Joosten Leo A.B., van der Meer Jos W.M., Netea Mihai G., Riksen Niels P. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2014;34(8):1731-1738.  
 [9] Keating ST, Groh L, Thiem K, et al. Rewiring of glucose metabolism defines trained immunity induced by oxidized low-density lipoprotein. *J Mol Med*. 2020;98(6):819-831.  
 [10] Petit J, Wiegertjes GF. Long-lived effects of administering  $\beta$ -glucans: Indications for trained immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology*. 2016;64:93-102.  
 [11] Bekkering S, van den Munckhof I, Nielen T, et al. Innate immune cell activation in symptomatic and asymptomatic atherosclerosis in humans *in vivo*. *Atherosclerosis*. 2016;252:e256.  
 [12] Pirillo A, Norata GD, Catapano AL. Lox-1, oxldl, and atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*. 2013;2013:1-12.  
 [13] Heinecke JW. Lipoprotein oxidation in



cardiovascular disease: chief culprit or innocent bystander? *Journal of Experimental Medicine*. 2006;203(4):813-816.

[14] Ohashi R, Mu H, Wang X, Yao Q, Chen C. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2005;98(12):845-856.

[15] Chistiakov DA, Melnichenko AA, Myasoedova VA, Grechko AV, Orekhov AN. Mechanisms of foam cell formation in atherosclerosis. *J Mol Med*. 2017;95(11):1153-1165.

[16] Kishimoto Y, Yoshida H, Kondo K. Potential anti-atherosclerotic properties of astaxanthin. *Marine Drugs*. 2016;14(2):35.

[17] van Tuijl J, Joosten LAB, Netea MG, Bekkering S, Riksen NP. Immunometabolism orchestrates training of innate immunity in atherosclerosis. *Cardiovasc Res*. 2019;115(9):1416-1424.

[18] Groh L, Keating ST, Joosten LAB, Netea MG, Riksen NP. Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis. *Semin Immunopathol*. 2018;40(2):203-214.

[19] Lu L, Chen Y, Zhu Y. The molecular basis of targeting PFKFB3 as a therapeutic strategy against cancer. *Oncotarget*. 2017;8(37):62793-62802.

[20] Arts RJW, Novakovic B, ter Horst R, et al. Glutaminolysis and fumarate accumulation integrate immunometabolic and epigenetic programs in trained immunity. *Cell Metabolism*. 2016;24(6):807-819.

[21] Riksen NP, Stienstra R. Metabolism of innate immune cells: impact on atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology*. 2018;29(5):359-367.

[22] van der Heijden CDCC, Noz MP, Joosten LAB, Netea MG, Riksen NP, Keating ST. Epigenetics and trained immunity. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2018;29(11):1023-1040.

[23] Mulder WJM, Ochando J, Joosten LAB, Fayad ZA, Netea MG. Therapeutic targeting of trained immunity. *Nat Rev Drug Discov*. 2019;18(7):553-566.

[24] Cheng S-C, Quintin J, Cramer RA, et al. Mtor- and hif-1 -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*. 2014;345(6204):1250684-1250684.

[25] Leentjens J, Bekkering S, Joosten LAB, Netea MG, Burgner DP, Riksen NP. Trained innate immunity as a novel mechanism linking

infection and the development of atherosclerosis. *Circ Res*. 2018;122(5):664-669.

[26] Nicorescu I, Dallinga GM, de Winther MPJ, Stroes ESG, Bahjat M. Potential epigenetic therapeutics for atherosclerosis treatment. *Atherosclerosis*. 2019;281:189-197.